

· 论著 ·

## 本文亮点:

- (1) 通过建立小鼠全层皮肤缺损创面模型,证实小鼠创伤后表皮中出现了一群V $\gamma$ 4T细胞;雷帕霉素可能通过抑制CC趋化因子配体20的表达,引起创伤后V $\gamma$ 4T细胞向表皮的募集减少,同时雷帕霉素能够抑制V $\gamma$ 4T细胞分泌IL-22。
- (2) 推测创伤后表皮中V $\gamma$ 4T细胞减少及其分泌IL-22减少导致了应用雷帕霉素的小鼠的创面愈合障碍。



## V $\gamma$ 4T细胞在应用雷帕霉素的小鼠全层皮肤缺损创面愈合障碍中的作用及其机制

刘中阳 程旭 张景霞 张建文 郭丽丽 李广帅 史珂

郑州大学第一附属医院医学美容中心,郑州 450052

通信作者:史珂,Email:822870715@qq.com

**【摘要】** **目的** 探讨V $\gamma$ 4T细胞在应用雷帕霉素的小鼠全层皮肤缺损创面愈合障碍中的作用及其机制。**方法** 采用实验研究方法,选取86只8~12周龄雄性C57BL/6J小鼠(以下简称野生型小鼠)进行后续实验。取5只野生型小鼠,从其腋窝淋巴结分离V $\gamma$ 4T细胞用于后续实验。取42只野生型小鼠,腹腔注射雷帕霉素建立应用雷帕霉素的小鼠模型,用于后续实验。取18只野生型小鼠,按随机数字表法(分组方法下同)分为不进行任何处理的正常对照组和单纯创伤组、创伤+CC趋化因子配体20(CCL20)抑制剂组(每组6只),将后2组小鼠背部制成全层皮肤缺损创面(创面模型下同),创伤+CCL20抑制剂组小鼠伤后连续3d于创缘皮下注射CCL20抑制剂,另取6只应用雷帕霉素的小鼠建立创面模型作为雷帕霉素+创伤组,伤后3d,采用酶消化法提取各创伤小鼠创周皮肤组织的表皮细胞,采用流式细胞仪检测表皮细胞中V $\gamma$ 4T细胞的百分比。于适宜时间点取正常对照组小鼠背部正常皮肤组织的表皮细胞同前进行检测。取5只野生型小鼠建立创面模型,伤后3d,提取创周皮肤组织的表皮细胞,采用流式细胞分选仪将细胞群分为V $\gamma$ 4T细胞、V $\gamma$ 3T细胞及 $\gamma\delta$ 阴性细胞,分别设为V $\gamma$ 4T细胞组、V $\gamma$ 3T细胞组及 $\gamma\delta$ 阴性细胞组(均与B16小鼠黑色素瘤细胞混合),以单纯B16小鼠黑色素瘤细胞为黑色素瘤细胞对照组,采用实时荧光定量反转录PCR(RT-PCR)法检测各组细胞白细胞介素22(IL-22)mRNA表达情况(样本数为6)。取30只应用雷帕霉素的小鼠建立创面模型,伤后即刻分为进行相应注射处理的单纯V $\gamma$ 4T细胞组与V $\gamma$ 4T细胞+IL-22抑制剂组以及注射PBS的雷帕霉素对照组(每组10只);另取10只野生型小鼠建立创面模型并注射PBS作为野生型对照组。各组小鼠均连续注射6d,伤后1、2、3、4、5、6d于当日注射后计算4组小鼠创面面积百分比。分别取6只野生型小鼠和6只应用雷帕霉素的小鼠建立创面模型,作为野生型组和雷帕霉素组,伤后3d,分别采用实时荧光定量RT-PCR法及蛋白质印迹法检测2组小鼠创周表皮组织中IL-22、CCL20的mRNA及蛋白的表达情况。取V $\gamma$ 4T细胞,分为不进行任何处理的正常对照组和用雷帕霉素处理的雷帕霉素组,培养24h,分别采用实时荧光定量RT-PCR法及蛋白质印迹法检测2组细胞中IL-22的mRNA及蛋白表达情况(样本数为6)。数据分析采用独立样本t检验、重复测量方差分析、单因素方差分析、Bonferroni法、Kruskal-Wallis H检验与Wilcoxon秩和检验。**结果** 单纯创伤组小鼠伤后3d创周皮肤组织的表皮

DOI: 10.3760/ema.j.cn501120-20201209-00523

**本文引用格式:**刘中阳,程旭,张景霞,等.V $\gamma$ 4T细胞在应用雷帕霉素的小鼠全层皮肤缺损创面愈合障碍中的作用及其机制[J].中华烧伤与创面修复杂志,2022,38(5):462-470. DOI: 10.3760/ema.j.cn501120-20201209-00523.

Liu ZY, Cheng X, Zhang JX, et al. Role and mechanism of V $\gamma$ 4 T cells in impaired wound healing of rapamycin-induced full-thickness skin defects in mice[J]. Chin J Burns Wounds, 2022, 38(5): 462-470. DOI: 10.3760/ema. j. cn501120-20201209-00523.



细胞中 V $\gamma$ 4T 细胞百分比为 0.66% (0.52%, 0.81%), 明显高于正常对照组小鼠正常皮肤组织的表皮细胞中的 0.09% (0.04%, 0.14%),  $Z=4.31, P<0.01$ ; 雷帕霉素+创伤组及创伤+CCL20 抑制剂组小鼠伤后 3 d 创周皮肤组织的表皮细胞中 V $\gamma$ 4T 细胞百分比分别为 0.25% (0.16%, 0.37%)、0.24% (0.17%, 0.35%), 均较单纯创伤组明显降低 ( $Z$  值分别为 2.27、2.25,  $P<0.05$ )。V $\gamma$ 4T 细胞组细胞中 IL-22 mRNA 表达水平明显高于 V $\gamma$ 3T 细胞组、 $\gamma\delta$  阴性细胞组、黑色素瘤细胞对照组 ( $Z$  值分别为 2.96、2.45、3.41,  $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与野生型对照组比较, 雷帕霉素对照组小鼠伤后 1~6 d 创面面积百分比均明显增大 ( $P<0.01$ ), V $\gamma$ 4T 细胞+IL-22 抑制剂组小鼠伤后 1 d 及伤后 3~6 d 创面面积百分比均明显增大 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与雷帕霉素对照组比较, 单纯 V $\gamma$ 4T 细胞组小鼠伤后 1~6 d 创面面积百分比均明显减小 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与单纯 V $\gamma$ 4T 细胞组比较, V $\gamma$ 4T 细胞+IL-22 抑制剂组小鼠伤后 3~6 d 创面面积百分比均明显增大 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。伤后 3 d, 与野生型组比较, 雷帕霉素组小鼠创周表皮组织中 IL-22 蛋白及 mRNA 的表达水平 ( $t$  值分别为 -7.82、-5.04,  $P<0.01$ )、CCL20 蛋白及 mRNA 的表达水平 ( $t$  值分别为 -7.12、-5.73,  $P<0.01$ ) 均显著下降。培养 24 h, 雷帕霉素组 V $\gamma$ 4T 细胞中 IL-22 蛋白及 mRNA 的表达水平均显著低于正常对照组 ( $t$  值分别为 -7.75、-6.04,  $P<0.01$ )。 **结论** 在全层皮肤缺损小鼠中, 雷帕霉素可能通过抑制 CCL20 表达使 CCL20 趋化系统受损导致 V $\gamma$ 4T 细胞向表皮的募集减少, 并同时抑制 V $\gamma$ 4T 细胞分泌 IL-22 从而减缓创面愈合速度。

**【关键词】** 西罗莫司; 伤口愈合; 趋化因子 CCL20; V $\gamma$ 4T 细胞; 白细胞介素 22

**基金项目:** 郑州大学第一附属医院青年基金项目

### Role and mechanism of V $\gamma$ 4 T cells in impaired wound healing of rapamycin-induced full-thickness skin defects in mice

Liu Zhongyang, Cheng Xu, Zhang Jingxia, Zhang Jianwen, Guo Lili, Li Guangshuai, Shi Ke

Medical Cosmetic Center, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Shi Ke, Email: 822870715@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the role and mechanism of V $\gamma$ 4 T cells in impaired wound healing of rapamycin-induced full-thickness skin defects in mice. **Methods** The experimental research methods were applied. Eighty-six C57BL/6J male mice (hereinafter briefly referred to as wild-type mice) aged 8–12 weeks were selected for the following experiments. V $\gamma$ 4 T cells were isolated from axillary lymph nodes of five wild-type mice for the following experiments. Intraperitoneal injection of rapamycin for 42 mice was performed to establish rapamycin-treated mice model for the following experiments. Eighteen wild-type mice were divided into normal control group without any treatment, trauma only group, and trauma+CC chemokine ligand 20 (CCL20) inhibitor group according to the random number table (the same grouping method below), with 6 mice in each group. The full-thickness skin defect wound was made on the back of mice in the latter two groups (the same wound model below), and mice in trauma+CCL20 inhibitor group were continuously injected subcutaneously with CCL20 inhibitor at the wound edge for 3 days after injury. Another 6 rapamycin-treated mice were used to establish wound model as rapamycin+trauma group. On post injury day (PID) 3, the epidermal cells of the skin tissue around the wound of each trauma mice were extracted by enzyme digestion, and the percentage of V $\gamma$ 4 T cells in the epidermal cells was detected by flow cytometry. In normal control group, the epidermal cells of the normal skin tissue in the back of mice were taken at the appropriate time point for detection as above. Five wild-type mice were used to establish wound models. On PID 3, the epidermal cells were extracted from the skin tissue around the wound. The cell populations were divided into V $\gamma$ 4 T cells, V $\gamma$ 3 T cells, and  $\gamma\delta$  negative cells by fluorescence-activated cell sorter, which were set as V $\gamma$ 4 T cell group, V $\gamma$ 3 T cell group, and  $\gamma\delta$  negative cell group (with cells in each group being mixed with B16 mouse melanoma cells), respectively. B16 mouse melanoma cells were used as melanoma cell control group. The expression of interleukin-22 (IL-22) mRNA in cells of each group was detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), with the number of samples being 6. Thirty rapamycin-treated mice were used to establish wound models, which were divided into V $\gamma$ 4 T cell only group and V $\gamma$ 4 T cell+IL-22 inhibitor group performed with corresponding injections and rapamycin control group injected with phosphate buffer solution (PBS) immediately after injury, with 10 mice in each group. Another 10 wild-type mice were taken to establish wound models and injected with PBS as wild-type control group. Mice in each group were injected continuously for 6 days. The percentage of wound area of mice in the four groups was calculated on PID 1, 2, 3, 4, 5, and 6 after injection on the same day. Six wild-type mice and 6 rapamycin-treated mice were taken respectively to establish wound models as wild-type group and rapamycin group. On PID 3, the mRNA and

protein expressions of IL-22 and CCL20 in the peri-wound epidermis tissue of mice in the two groups were detected by real-time fluorescence quantitative RT-PCR and Western blotting, respectively. The V $\gamma$ 4 T cells were divided into normal control group without any treatment and rapamycin-treated rapamycin group. After being cultured for 24 hours, the mRNA and protein expressions of IL-22 of cells in the two groups were detected by real-time fluorescence quantitative RT-PCR and Western blotting, respectively, with the number of samples being 6. Data were statistically analyzed with independent sample *t* test, analysis of variance for repeated measurement, one-way analysis of variance, Bonferroni method, Kruskal-Wallis *H* test, and Wilcoxon rank sum test. **Results** The percentage of V $\gamma$ 4 T cells in the epidermal cells of the skin tissue around the wound of mice in trauma only group on PID 3 was 0.66% (0.52%, 0.81%), which was significantly higher than 0.09% (0.04%, 0.14%) in the epidermal cells of the normal skin tissue of mice in normal control group ( $Z=4.31$ ,  $P<0.01$ ). The percentages of V $\gamma$ 4 T cells in the epidermal cells of the skin tissue around the wound of mice in rapamycin+trauma group and trauma+CCL20 inhibitor group on PID 3 were 0.25% (0.16%, 0.37%) and 0.24% (0.17%, 0.35%), respectively, which were significantly lower than that in trauma only group (with *Z* values of 2.27 and 2.25, respectively,  $P<0.05$ ). The mRNA expression level of IL-22 of cells in V $\gamma$ 4 T cell group was significantly higher than that in V $\gamma$ 3 T cell group,  $\gamma\delta$  negative cell group, and melanoma cell control group (with *Z* values of 2.96, 2.45, and 3.41, respectively,  $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with that in wild-type control group, the percentage of wound area of mice in rapamycin control group increased significantly on PID 1–6 ( $P<0.01$ ), the percentage of wound area of mice in V $\gamma$ 4 T cell+IL-22 inhibitor group increased significantly on PID 1 and PID 3–6 ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with that in rapamycin control group, the percentage of wound area of mice in V $\gamma$ 4 T cell only group decreased significantly on PID 1–6 ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with that in V $\gamma$ 4 T cell only group, the percentage of wound area of mice in V $\gamma$ 4 T cell+IL-22 inhibitor group increased significantly on PID 3–6 ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). On PID 3, compared with those in wild-type group, the expression levels of IL-22 protein and mRNA (with *t* values of -7.82 and -5.04, respectively,  $P<0.01$ ) and CCL20 protein and mRNA (with *t* values of -7.12 and -5.73, respectively,  $P<0.01$ ) were decreased significantly in the peri-wound epidermis tissue of mice in rapamycin group. After being cultured for 24 hours, the expression levels of IL-22 protein and mRNA in V $\gamma$ 4 T cells in rapamycin group were significantly lower than those in normal control group (with *t* values of -7.75 and -6.04, respectively,  $P<0.01$ ). **Conclusions** In mice with full-thickness skin defects, rapamycin may impair the CCL20 chemotactic system by inhibiting the expression of CCL20, leading to a decrease in the recruitment of V $\gamma$ 4 T cells to the epidermis, and at the same time inhibit the secretion of IL-22 by V $\gamma$ 4 T cells, thereby slowing the wound healing rate.

**【 Key words 】** Sirolimus; Wound healing; Chemokine CCL20; V $\gamma$ 4 T cells; Interleukin-22

**Fund program:** Youth Fund Project of the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University

雷帕霉素又名西罗莫司,是一种有效的 $\alpha\beta$ T细胞抑制剂<sup>[1]</sup>,通常被用于预防患者因移植实体器官而产生的免疫排斥反应<sup>[2-4]</sup>,但是行器官移植后的患者通常会伴有创面愈合延迟的情况<sup>[5-7]</sup>。研究表明,雷帕霉素可能通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路,使树突状表皮T细胞(DETC)分泌的胰岛素样生长因子I、KC生长因子减少,进而导致创面愈合障碍<sup>[8-9]</sup>。

DETC交错分布于表皮组织中,其表型为V $\gamma$ 3,是上皮受损中主要的效应T细胞,在创面愈合中起着重要作用<sup>[10-13]</sup>;而分布于真皮组织中的 $\gamma\delta$ T细胞大部分高表达V $\gamma$ 4,与表皮组织中的DETC明显不同<sup>[14]</sup>。研究表明,真皮组织中V $\gamma$ 4T细胞功能障碍可能是引起糖尿病小鼠全层皮肤缺损创面延迟愈合的原因之一<sup>[15]</sup>,但此类细胞在应用雷帕霉素治疗后导致创面愈合障碍中的作用及其机制目前尚不清楚。研究表明,在银屑病小鼠模型中,表皮中一

群高表达趋化因子受体6(CCR6)、不表达V $\gamma$ 3的 $\gamma\delta$ T细胞分泌IL-22,该分泌因子能够引起KC过度增殖<sup>[16]</sup>;同时IL-22作为一个能够加速创面再上皮化及愈合的重要细胞因子<sup>[17]</sup>,其在创周表皮组织中是否仍由类似的细胞分泌鲜见研究报道。因此,本研究拟探讨V $\gamma$ 4T细胞在应用雷帕霉素的小鼠全层皮肤缺损创面愈合障碍中的作用及其机制。

## 1 材料与方法

本实验研究中的动物实验符合国家和郑州大学第一附属医院关于动物使用的相关规定。

### 1.1 动物及主要试剂与仪器来源

86只8~12周龄无特殊病原体级健康雄性C57BL/6J小鼠(以下称野生型小鼠),体重20~22g,由郑州大学动物实验中心提供,许可证号:SYXK(豫)2018-0004。B16小鼠黑色素瘤细胞购自上海奥陆生物科技有限公司。抗小鼠V $\gamma$ 4 T细胞受体

(TCR)抗体购自美国BioXCell公司,雷帕霉素购自美国Bio-Rad公司,IL-22抑制剂、CC趋化因子配体20(CCL20)抑制剂购自美国R&D公司,RPMI 1640培养基、牛血清白蛋白、胎牛血清、PBS、胰蛋白酶购自美国Gibco公司,兔抗小鼠CCL20单克隆抗体购自美国Abcam公司,大鼠抗小鼠CD16/32单克隆抗体、亮紫421标记的亚美尼亚仓鼠抗小鼠 $\gamma\delta$ TCR单克隆抗体、藻红蛋白标记的叙利亚仓鼠抗小鼠V $\gamma$ 3TCR单克隆抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的亚美尼亚仓鼠抗小鼠V $\gamma$ 4TCR单克隆抗体及藻红蛋白标记的亚美尼亚仓鼠抗小鼠CCR6单克隆抗体、大鼠抗小鼠IL-22单克隆抗体购自美国BioLegend公司,小鼠源性GAPDH单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠IgG多克隆抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体及山羊抗大鼠IgG多克隆抗体购自美国eBioscience公司。Chemi DOC™ XRS<sup>+</sup>型化学发光成像分析仪购自美国Bio-Rad公司,Attune NxT型流式细胞仪购自美国Life Technologies公司,FACSAria型流式细胞分选仪购自美国BD Biosciences公司。

### 1.2 V $\gamma$ 4T细胞分离与培养

取5只野生型小鼠,行颈椎脱臼处死,用无菌解剖器械分离腋窝淋巴结并放置于无菌PBS中,用无菌毛玻璃片轻柔研磨组织,将其制成单细胞悬液,用孔径70  $\mu$ m的无菌滤器过滤后,在室温下以离心半径10 cm(离心半径下同)、1 000 r/min离心8 min。弃去上清液,以PBS重新悬浮,使用淋巴细胞分离液分离富集淋巴细胞,室温下以1 200 r/min离心8 min。弃去上清液,用PBS重新悬浮,计数,将细胞浓度调整为 $1\times 10^6$ 个/mL。将抗小鼠V $\gamma$ 4TCR单克隆抗体加入PBS中制成抗体包被液,将抗体包被液加入48孔板中,每孔100  $\mu$ L,置于4  $^{\circ}$ C冰箱中过夜。取出预包被好的48孔板,吸去抗体包被液,接种提取的细胞,每孔接种 $1\times 10^6$ 个,于培养箱中用含体积分数15%胎牛血清的RPMI 1640培养基常规培养6 d,采用流式细胞术鉴定V $\gamma$ 4T细胞纯度为95%后,用于后续实验。

### 1.3 应用雷帕霉素的小鼠模型构建

取42只野生型小鼠,根据文献[18]中的方法,对小鼠进行3 mg/kg雷帕霉素腹腔注射(120  $\mu$ g/mL)从而在体抑制mTOR信号通路,每天注射1次,连续注射4周后成功建立应用雷帕霉素的小鼠模型,用于后续实验。

### 1.4 流式细胞术检测小鼠表皮中V $\gamma$ 4T细胞百分比

取18只野生型小鼠,按随机数字表法(分组方法下同)分为不进行任何处理的正常对照组和单纯创伤组、创伤+CCL20抑制剂组(每组6只),后2组小鼠常规背部备皮麻醉,在背部中线两侧以直径2.5 mm打孔器打孔(每侧打1个孔)建立全层皮肤缺损创面(创面模型下同),伤后分笼饲养,自由饮食。创伤+CCL20抑制剂组小鼠伤后连续3 d于创缘皮下注射20  $\mu$ g质量浓度为400  $\mu$ g/mL的CCL20抑制剂,均每天注射1次。另取6只应用雷帕霉素的小鼠建立创面模型作为雷帕霉素+创伤组。

伤后3 d,采用酶消化法提取各创伤小鼠创周皮肤组织(同时切取每只鼠的2个创面的组织,算作1个样本,下同)的表皮细胞:取创周3 mm范围内皮肤,清除皮下组织,浸泡于配制好的酶消化溶液(取胰蛋白酶粉1 g、氯化钠2.94 g、氯化钾0.134 g、葡萄糖0.334 g,加去离子水溶解,定容至总体积为334 mL,并调节pH值为7.6)中,4  $^{\circ}$ C下静置5 h。用镊子撕下表皮组织,剪刀剪碎后,置于3 g/L胰蛋白酶中,37  $^{\circ}$ C消化约10 min。加入含体积分数15%胎牛血清的RPMI 1640培养基终止消化。用孔径40  $\mu$ m的无菌滤器过滤溶液后,在室温下以1 000 r/min离心10 min,弃去上清液,即得创周皮肤组织的表皮细胞。以PBS重新悬浮表皮细胞,加入大鼠抗小鼠CD16/32单克隆抗体(稀释比为1:200),于4  $^{\circ}$ C孵育30 min封闭细胞表面非特异性染色受体后,加入亮紫421标记的亚美尼亚仓鼠抗小鼠 $\gamma\delta$ TCR单克隆抗体、藻红蛋白标记的叙利亚仓鼠抗小鼠V $\gamma$ 3TCR单克隆抗体、FITC标记的亚美尼亚仓鼠抗小鼠V $\gamma$ 4TCR单克隆抗体及藻红蛋白标记的亚美尼亚仓鼠抗小鼠CCR6单克隆抗体(稀释比均为1:100),37  $^{\circ}$ C孵育30 min。用PBS清洗2次后重新悬浮细胞,用流式细胞仪检测各创伤小鼠创周皮肤组织的表皮细胞中V $\gamma$ 4T细胞的百分比。于适宜时间点取正常对照组小鼠背部正常皮肤组织,同前提取表皮细胞进行检测。

### 1.5 实时荧光定量RT-PCR法检测野生型小鼠创周表皮各类细胞群IL-22 mRNA表达

取5只野生型小鼠,建立创面模型并同1.4提取伤后3 d创周皮肤组织的表皮细胞。采用文献[16]报道的方法,使用流式细胞分选仪将表皮细胞分选为V $\gamma$ 4T细胞、V $\gamma$ 3T细胞及 $\gamma\delta$ 阴性细胞,分别



设为 V $\gamma$ 4T 细胞组、V $\gamma$ 3T 细胞组及  $\gamma\delta$  阴性细胞组,其中  $\gamma\delta$  阴性细胞代表表皮中除 V $\gamma$ 4T 细胞、V $\gamma$ 3T 细胞外的所有细胞。将分选后获得的同等数量的 3 组细胞群( $1 \times 10^3$  个)分别混合其 10 倍数量的 B16 小鼠黑色素瘤细胞,以此来获得足够的 RNA。以单纯 B16 小鼠黑色素瘤细胞(细胞总量同前述各组)为黑色素瘤细胞对照组。采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,用紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。取 2  $\mu$ g RNA,用无 RNA 酶水稀释,按照 40  $\mu$ L 反应体系反转录成互补 DNA,采用实时荧光定量 PCR 仪检测反转录产物中 IL-22 的 mRNA 表达。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成(下同)。IL-22 上游引物为 5'-GCTTGGAGAGAGTGGAGAG-3',下游引物为 5'-TTTAGAAGGCAGGAAGGAG-3',产物大小为 127 bp;内参照为 GAPDH,其上游引物为 5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3',下游引物为 5'-GAAGGTGGAAGAGTGGGAGT-3',产物大小为 111 bp。采用  $\Delta$  循环阈值(Ct)法的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  处理结果,计算各组细胞 IL-22 mRNA 的相对表达量。本实验各组样本数均为 6。

### 1.6 小鼠创面愈合情况观察

取 10 只野生型小鼠,建立创面模型作为野生型对照组;另取 30 只应用雷帕霉素的小鼠,建立创面模型,伤后即刻分为雷帕霉素对照组以及单纯 V $\gamma$ 4T 细胞组与 V $\gamma$ 4T 细胞+IL-22 抑制剂组(每组 10 只),后 2 组小鼠伤后即刻开始分别连续 6 d 经创缘皮下注射 V $\gamma$ 4T 细胞、V $\gamma$ 4T 细胞+IL-22 抑制剂,均每天注射 1 次,每次每个创面注射 1 mL 浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的 V $\gamma$ 4T 细胞,IL-22 抑制剂质量浓度为 400  $\mu$ g/mL、体积为 0.05 mL;野生型对照组、雷帕霉素对照组注射 1.05 mL PBS。伤后 0(即刻)、1、2、3、4、5、6 d 于当日注射后计算 4 组小鼠创面面积百分比。在创面旁放置参照物,以数码相机垂直于创面、镜头距离创面 15 cm、微距模式下,采集创面图像,每张图片包括创面及参照物。以 Image J 1.8.0 图像分析软件(美国国立卫生研究院)测量创面的大小(每只鼠 2 个创面测量结果取均值)。伤后各时间点创面面积百分比=伤后各时间点创面面积 $\div$ 伤后 0 d 创面面积 $\times 100\%$ 。

**1.7 实时荧光定量 RT-PCR 法与蛋白质印迹法分别检测小鼠创周表皮组织中 IL-22 与 CCL20 mRNA 及蛋白表达**

分别取 6 只野生型小鼠和 6 只应用雷帕霉素的

小鼠建立创面模型,作为野生型组和雷帕霉素组。伤后 3 d,同 1.4 取每只小鼠的创周表皮组织,分成 2 份。

取 1 份表皮组织,在液氮中碾磨粉碎,同 1.5 采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测各组小鼠创周表皮组织中 IL-22、CCL20 mRNA 表达情况。CCL20 上游引物为 5'-CAGCCAGGCAGAAGCAGCAA-3',下游引物为 5'-GGCCATCTGTCTTGTGAAACCCA-3',产物大小为 100 bp;IL-22 的引物序列和产物大小同 1.5。

取另 1 份表皮组织,在液氮中碾磨粉碎,提取细胞总蛋白,加入细胞裂解液,4  $^{\circ}$ C 下振荡 20 min,以 14 000 r/min 离心 5 min 后测定蛋白浓度。每只小鼠取 50  $\mu$ g 总蛋白上样,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,湿法转膜,用 30 g/L 牛血清白蛋白溶液封闭,室温下振荡 2 h。加入兔抗小鼠 CCL20 单克隆一抗(稀释比为 1:200)、大鼠抗小鼠 IL-22 单克隆一抗(稀释比为 1:200)、小鼠源性 GAPDH 单克隆一抗(稀释比为 1:2 000),4  $^{\circ}$ C 静置过夜。加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 多克隆二抗、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆二抗及山羊抗大鼠 IgG 多克隆二抗(稀释比均为 1:2 000),室温静置 1 h。化学发光成像分析仪进行灰度分析,结果以目的蛋白 IL-22、CCL20 灰度值与内参照 GAPDH 灰度值的比值表示。

**1.8 实时荧光定量 RT-PCR 法与蛋白质印迹法检测 V $\gamma$ 4T 细胞中 IL-22 的 mRNA 与蛋白表达**

取 V $\gamma$ 4T 细胞,将细胞接种到 48 孔板中,每孔细胞数为  $1 \times 10^6$  个,用 RPMI 1640 培养基常规培养,分为不进行任何处理的正常对照组和用雷帕霉素处理的雷帕霉素组。培养 24 h,同 1.7 分别采用实时荧光定量 RT-PCR 法及蛋白质印迹法检测 2 组细胞中 IL-22 的 mRNA 及蛋白表达。本实验中 2 组样本数均为 6。

### 1.9 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 23.0 统计软件分析实验数据。计量资料数据中符合正态分布者用  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组分组的组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间多个时间点总体比较行重复测量方差分析,多组间单一时间点总体比较行单因素方差分析,多重比较采用 Bonferroni 法(软件自动略去该统计量值)。计量资料数据中不符合正态分布者以 *M* (*min*, *max*) 表示,组间总体比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,组间两两比较采用 Wilcoxon 秩和检验。*P* <

0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠表皮中 V $\gamma$ 4T 细胞百分比

正常对照组小鼠正常皮肤组织与单纯创伤组、雷帕霉素+创伤组、创伤+CCL20 抑制剂组小鼠伤后 3 d 创周皮肤组织的表皮细胞中 V $\gamma$ 4T 细胞百分比分别为 0.09% (0.04%, 0.14%)、0.66% (0.52%, 0.81%)、0.25% (0.16%, 0.37%)、0.24% (0.17%, 0.35%)，组间总体比较，差异有统计学意义 ( $H=18.58, P<0.001$ )。与正常对照组比较，单纯创伤组小鼠 V $\gamma$ 4T 细胞百分比明显升高 ( $Z=4.31, P<0.001$ )；与单纯创伤组比较，雷帕霉素+创伤组、创伤+CCL20 抑制剂组小鼠 V $\gamma$ 4T 细胞百分比明显降低 ( $Z$  值分别为 2.27、2.25,  $P$  值分别为 0.023、0.025)。

### 2.2 野生型小鼠创周表皮各类细胞群 IL-22 mRNA 表达

V $\gamma$ 4T 细胞组、V $\gamma$ 3T 细胞组及  $\gamma\delta$  阴性细胞组与黑色素瘤细胞对照组细胞中 IL-22 mRNA 表达水平分别为 0.801 (0.560, 0.901)、0.064 (0.037, 0.138)、0.099 (0.031, 0.199)、0.053 (0.037, 0.105)，组间总体比较，差异有统计学意义 ( $H=13.90, P=0.003$ )。V $\gamma$ 4T 细胞组细胞中 IL-22

mRNA 表达量明显高于 V $\gamma$ 3T 细胞组、 $\gamma\delta$  阴性细胞组、黑色素瘤细胞对照组 ( $Z$  值分别为 2.96、2.45、3.41,  $P$  值分别为 0.003、0.014、0.001)。

### 2.3 小鼠创面愈合情况

与野生型对照组比较，雷帕霉素对照组小鼠伤后 1~6 d 创面面积百分比均明显增大 ( $P<0.01$ )；单纯 V $\gamma$ 4T 细胞组小鼠伤后 1~6 d 创面面积百分比均无明显变化 ( $P>0.05$ )；V $\gamma$ 4T 细胞+IL-22 抑制剂组小鼠伤后 2 d 创面面积百分比无明显变化 ( $P>0.05$ )，但伤后 1 d 及伤后 3~6 d 创面面积百分比均明显增大 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。伤后 1~6 d，与雷帕霉素对照组比较，单纯 V $\gamma$ 4T 细胞组小鼠创面面积百分比均明显减小 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )，V $\gamma$ 4T 细胞+IL-22 抑制剂组小鼠创面面积百分比均无明显变化 ( $P>0.05$ )。与单纯 V $\gamma$ 4T 细胞组比较，V $\gamma$ 4T 细胞+IL-22 抑制剂组小鼠伤后 1、2 d 创面面积百分比均无明显变化 ( $P>0.05$ )，但伤后 3~6 d 创面面积百分比均明显增大 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。见表 1。伤后 3 d，4 组小鼠创面面积情况见图 1。

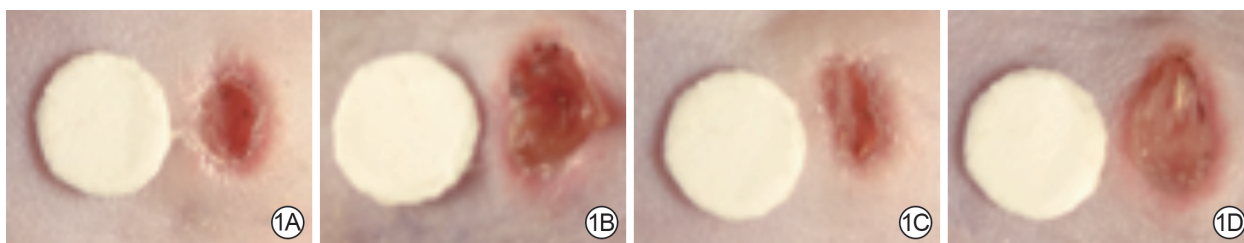
### 2.4 小鼠创周表皮组织中 CCL20 和 IL-22 的蛋白与 mRNA 表达

伤后 3 d，雷帕霉素组小鼠创周表皮组织中 IL-22 蛋白及 mRNA 的表达水平均较野生型组显著下降 ( $t$  值分别为 -7.82、-5.04,  $P$  值分别为  $<0.001$ 、

表 1 4 组全层皮肤缺损小鼠伤后各时间点创面面积百分比比较 (%， $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
野生型对照组	10	79.3 $\pm$ 8.4	65.7 $\pm$ 9.6	47.0 $\pm$ 9.7	31.5 $\pm$ 7.8	21.5 $\pm$ 8.1	11.1 $\pm$ 4.5
雷帕霉素对照组	10	93.3 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	84.0 $\pm$ 8.0 <sup>b</sup>	72.5 $\pm$ 9.2 <sup>a</sup>	56.6 $\pm$ 9.7 <sup>a</sup>	42.9 $\pm$ 7.6 <sup>a</sup>	34.5 $\pm$ 7.3 <sup>a</sup>
单纯 V $\gamma$ 4T 细胞组	10	85.4 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>	70.0 $\pm$ 7.9 <sup>d</sup>	54.3 $\pm$ 9.4 <sup>d</sup>	37.4 $\pm$ 8.3 <sup>d</sup>	27.7 $\pm$ 5.3 <sup>d</sup>	16.2 $\pm$ 3.9 <sup>d</sup>
V $\gamma$ 4T 细胞+白细胞介素 22 抑制剂组	10	88.3 $\pm$ 6.1 <sup>c</sup>	76.6 $\pm$ 9.9	68.4 $\pm$ 10.2 <sup>ac</sup>	56.2 $\pm$ 14.2 <sup>af</sup>	44.0 $\pm$ 11.1 <sup>af</sup>	29.9 $\pm$ 8.8 <sup>af</sup>
$F$ 值		9.73	8.07	15.46	15.66	18.26	29.26
$P$ 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：除野生型对照组外，其余 3 组小鼠均应用了雷帕霉素；处理因素主效应， $F=18.88, P<0.001$ ；时间因素主效应， $F=1126.05, P<0.001$ ；两者交互作用， $F=5.05, P<0.001$ ；与野生型对照组比较，<sup>a</sup> $P<0.01$ ，<sup>c</sup> $P<0.05$ ；与雷帕霉素对照组比较，<sup>b</sup> $P<0.05$ ，<sup>d</sup> $P<0.01$ ；与单纯 V $\gamma$ 4T 细胞组比较，<sup>e</sup> $P<0.05$ ，<sup>f</sup> $P<0.01$



注：除野生型对照组外，其余 3 组小鼠均应用了雷帕霉素

图 1 4 组全层皮肤缺损小鼠伤后 3 d 创面面积。1A. 野生型对照组创面面积较参照物明显缩小；1B. 雷帕霉素对照组创面面积明显大于图 1A；1C. 单纯 V $\gamma$ 4T 细胞组创面面积与图 1A 相近，明显小于图 1B；1D. V $\gamma$ 4T 细胞+白细胞介素 22 抑制剂组创面面积与图 1B 相近，明显大于图 1C

0.001); 伤后 3 d, 雷帕霉素组小鼠创周表皮组织中 CCL20 蛋白及 mRNA 的表达水平均较野生型组显著下降(*t* 值分别为 -7.12、-5.73, *P* < 0.001)。见图 2。

### 2.5 V $\gamma$ 4T 细胞中 IL-22 的蛋白与 mRNA 表达

培养 24 h, 雷帕霉素组 V $\gamma$ 4T 细胞中 IL-22 的蛋白及 mRNA 表达水平均较正常对照组显著下降(*t* 值分别为 -7.75、-6.04, *P* < 0.001)。见图 3。

### 3 讨论

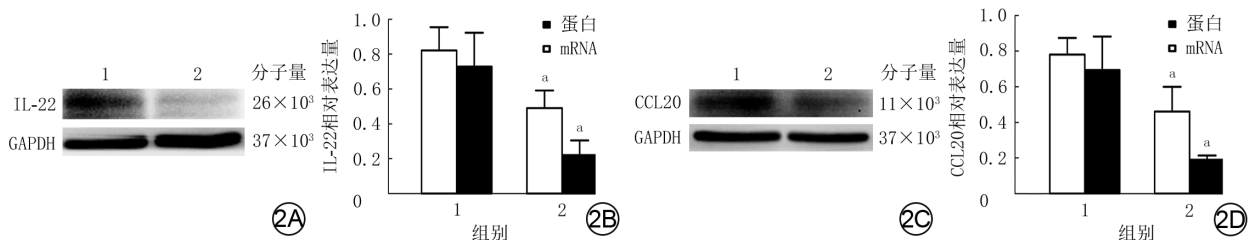
雷帕霉素作为一种有效的临床治疗药物, 因对 T 细胞的抑制作用, 被用于预防移植手术后的排斥反应<sup>[18]</sup>, 常被涂抹于动脉支架上降低支架对血管造成的不良反应<sup>[19]</sup>; 同时研究也显示, 雷帕霉素具有抗肿瘤细胞增殖和抗肿瘤血管生成的作用<sup>[20-21]</sup>。 $\gamma\delta$ T 细胞是皮肤免疫系统中的重要组成部分, 其不同亚群分别通过分泌生长因子和炎症因子在动态塑造早期创面微环境中起关键作用<sup>[22-24]</sup>。近年来的研究显示, 雷帕霉素通过抑制 mTOR 信号通路<sup>[25]</sup>, 导致 DETC 存活障碍及功能异常, 造成创面愈合延迟<sup>[8-9]</sup>。

CCR6 是一种 G 蛋白偶联的 CCR, CCL20 是 CCR6 的唯一配体<sup>[26]</sup>, CCL20/CCR6 趋化系统对  $\gamma\delta$ T 细胞的迁移有重要的影响<sup>[27]</sup>。本课题组在前期研究中观察到, 在糖尿病小鼠全层皮肤缺损创面模型中, 创周真皮 CCL20/CCR6 趋化系统受损, 从而引起真皮中 V $\gamma$ 4T 细胞减少, 这可能是导致糖尿病小鼠创面愈合障碍的原因之一<sup>[15]</sup>。而关于银屑病小鼠模型的研究显示, 表皮中出现一群高表达 CCR6 的  $\gamma\delta$ T 细胞, 它们通过 CCL20/CCR6 通路向表皮募集, 而抑制 CCL20 的表达能够明显减少此类细胞向表皮的募集<sup>[28-29]</sup>。因此, 本研究利用小鼠全层皮肤缺损创面模型进行了相应的实验, 结果显示单纯创伤组野生型小鼠伤后 3 d 的创周表皮中出现了一群  $\gamma\delta$ T 细胞, 它们表达 V $\gamma$ 4, 这与表皮中常驻的 DETC

(表达 V $\gamma$ 3) 明显不同, 但此类细胞在雷帕霉素+创伤组应用雷帕霉素的小鼠创周表皮中的百分比较单纯创伤组明显下降, 表明雷帕霉素可能影响了这群细胞向创周表皮的募集, 同时在创伤+CCL20 抑制剂组小鼠中, V $\gamma$ 4T 细胞在创周表皮中的百分比也较单纯创伤组下降, 表明 CCL20 通路可能在该类细胞向表皮的募集中起重要作用。综合分析, 本课题组推测, 雷帕霉素可能通过抑制 CCL20 的表达, 从而使创伤后 V $\gamma$ 4T 细胞向表皮的募集减少。

IL-22 是一种能够介导免疫系统与表皮细胞对话的重要细胞因子<sup>[30-31]</sup>。研究显示, IL-22 具有明显的促进糖尿病小鼠全层皮肤缺损创面愈合的作用<sup>[32-33]</sup>。而且银屑病小鼠出现表皮增厚、KC 过度增殖的现象, 也与皮肤中 IL-22 的表达增高有关<sup>[34-35]</sup>。同时研究显示, IL-22 主要由表皮中新出现的表达 CCR6 而不表达 V $\gamma$ 3 的  $\gamma\delta$ T 细胞分泌<sup>[16]</sup>。考虑到创伤后新生表皮同样有增厚及 KC 增殖活跃的表现, 本研究通过建立小鼠全层皮肤缺损创面模型进行相关研究, 结果显示, 与 V $\gamma$ 3T 细胞相比, 野生型小鼠伤后 3 d 表皮中 V $\gamma$ 4T 细胞高表达 IL-22 mRNA, 表明 V $\gamma$ 4T 细胞可能是创伤后表皮中 IL-22 的主要来源。

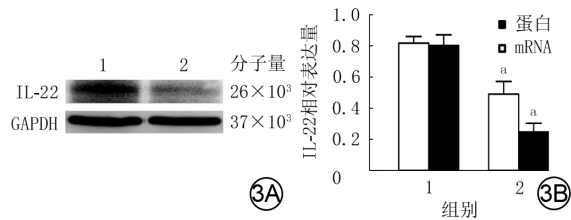
由于雷帕霉素导致了创伤后 V $\gamma$ 4T 细胞向表皮的募集障碍, 本课题组进一步探究 V $\gamma$ 4T 细胞及 IL-22 与应用雷帕霉素的小鼠创面愈合障碍的关系。本研究在体外分离培养高纯度 V $\gamma$ 4T 细胞的前提下, 观察野生型小鼠、仅应用雷帕霉素的小鼠、创缘单纯注射 V $\gamma$ 4T 细胞的应用雷帕霉素的小鼠及创缘同时注射 V $\gamma$ 4T 细胞和 IL-22 抑制剂的应用雷帕霉素的小鼠伤后 6 d 内的创面愈合情况。结果显示, 与野生型小鼠相比, 仅应用雷帕霉素的小鼠、应用雷帕霉素的小鼠应用 V $\gamma$ 4T 细胞+IL-22 抑制剂后的创面愈合速度明显变慢, 但是应用雷帕霉素的小鼠应用 V $\gamma$ 4T 细胞后的创面愈合速度较仅应用雷帕霉



注: 条带图上方与条图横坐标下 1、2 均分别指野生型组、雷帕霉素组; IL-22 为白细胞介素 22, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, CCL20 为 CC 趋化因子配体 20; 与野生型组比较, \**P* < 0.01

图 2 2 组全层皮肤缺损小鼠伤后 3 d 创周表皮组织中 IL-22 和 CCL20 的蛋白与 mRNA 表达。2A. 蛋白质印迹法检测 IL-22 蛋白表达; 2B. IL-22 蛋白与 mRNA 的表达; 2C. 蛋白质印迹法检测 CCL20 蛋白表达; 2D. CCL20 蛋白与 mRNA 的表达





注:条带图上方与条图横坐标下1、2均分别指正常对照组、雷帕霉素组;IL-22为白细胞介素22,GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶;与正常对照组比较,\**P*<0.01

**图3** 2组V $\gamma$ 4T细胞培养24h的IL-22蛋白与mRNA表达。  
3A.蛋白质印迹法检测IL-22的蛋白表达;3B.IL-22蛋白与mRNA的表达

素的小鼠有了明显提升,这表明V $\gamma$ 4T细胞促进了应用雷帕霉素的小鼠的创面愈合,而IL-22抑制剂阻断了V $\gamma$ 4T细胞促进应用雷帕霉素的小鼠创面愈合的作用。综合4组小鼠创面愈合情况,本课题组分析V $\gamma$ 4T细胞伤后向表皮募集并分泌IL-22可能有利于改善雷帕霉素导致的创面愈合障碍。结合实验展示的雷帕霉素抑制V $\gamma$ 4T细胞分泌IL-22,应用雷帕霉素的小鼠表皮IL-22及CCL20表达下降,而抑制CCL20导致V $\gamma$ 4T细胞伤后向表皮募集障碍的结果,本课题组推测,雷帕霉素不仅通过抑制CCL20的表达使V $\gamma$ 4T细胞伤后向表皮募集减少,同时抑制V $\gamma$ 4T细胞分泌IL-22从而导致表皮IL-22表达降低,进而延缓了创面愈合。

综上所述,雷帕霉素可能通过抑制CCL20创伤后表达使CCL20/CCR6趋化系统受损导致V $\gamma$ 4T细胞向表皮募集减少,并同时抑制V $\gamma$ 4T细胞分泌IL-22从而减缓创面愈合速度。本研究阐明了雷帕霉素在创面愈合障碍中的影响机制,为如何在应用雷帕霉素进行免疫治疗时防止创面愈合延迟提供了新的方向。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 刘中阳:研究指导、论文修改以及经费支持;程旭、史珂:实验操作、论文撰写;张景霞、张健文:整理数据与统计分析;郭丽丽、李广帅:论文修改

**参考文献**

[1] Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action[J]. *Transplant Proc*, 2003, 35(3 Suppl):S7-14. DOI:10.1016/s0041-1345(03)00211-2.

[2] Hymes LC, Warshaw BL. Sirolimus in pediatric patients: results in the first 6 months post-renal transplant[J]. *Pediatr Transplant*, 2005, 9(4):520-522. DOI:10.1111/j.1399-3046.2005.00324.x.

[3] Schäffer M, Schier R, Napirei M, et al. Sirolimus impairs wound healing[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2007, 392(3): 297-303. DOI: 10.1007/s00423-007-0174-5.

[4] MacDonald AS. Rapamycin in combination with cyclosporine or tacrolimus in liver, pancreas, and kidney transplantation[J].

*Transplant Proc*, 2003, 35(3 Suppl): S201-208. DOI: 10.1016/s0041-1345(03)00231-8.

[5] Kuppahally S, Al-Khaldi A, Weissshaar D, et al. Wound healing complications with de novo sirolimus versus mycophenolate mofetil-based regimen in cardiac transplant recipients[J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(5 Pt 1):986-992. DOI:10.1111/j.1600-6143.2006.01282.x.

[6] Dean PG, Lund WJ, Larson TS, et al. Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus[J]. *Transplantation*, 2004, 77(10):1555-1561. DOI:10.1097/01.tp.0000123082.31092.53.

[7] Valente JF, Hricik D, Weigel K, et al. Comparison of sirolimus vs. mycophenolate mofetil on surgical complications and wound healing in adult kidney transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2003, 3(9):1128-1134. DOI:10.1034/j.1600-6143.2003.00185.x.

[8] Mills RE, Taylor KR, Podshivalova K, et al. Defects in skin gamma delta T cell function contribute to delayed wound repair in rapamycin-treated mice[J]. *J Immunol*, 2008, 181(6): 3974-3983. DOI:10.4049/jimmunol.181.6.3974.

[9] Haidinger M, Poglitsch M, Geyeregger R, et al. A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation[J]. *J Immunol*, 2010, 185(7): 3919-3931. DOI: 10.4049/jimmunol.1000296.

[10] Yanez DA, Lacher RK, Vidyarthi A, et al. The role of macrophages in skin homeostasis[J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(3/4): 455-463. DOI:10.1007/s00424-017-1953-7.

[11] Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing[J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 283-289. DOI:10.2741/1184.

[12] Sutoh Y, Mohamed RH, Kasahara M. Origin and evolution of dendritic epidermal T cells[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:1059. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01059.

[13] Chen C, Meng Z, Ren H, et al. The molecular mechanisms supporting the homeostasis and activation of dendritic epidermal T cell and its role in promoting wound healing[J/OL]. *Burns Trauma*, 2021, 9:tkab009[2022-03-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34212060/>. DOI:10.1093/burnst/tkab009.

[14] Marshall AS, Silva JR, Bannerman CA, et al. Skin-resident  $\gamma\delta$  T cells exhibit site-specific morphology and activation states[J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019:9020234. DOI:10.1155/2019/9020234.

[15] Liu Z, Xu Y, Zhang X, et al. Defects in dermal V $\gamma$ 4  $\gamma\delta$  T cells result in delayed wound healing in diabetic mice[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(6):2667-2680.

[16] Mabuchi T, Takekoshi T, Hwang ST. Epidermal CCR6+  $\gamma\delta$  T cells are major producers of IL-22 and IL-17 in a murine model of psoriasisform dermatitis[J]. *J Immunol*, 2011, 187(10): 5026-5031. DOI:10.4049/jimmunol.1101817.

[17] McGee HM, Schmidt BA, Booth CJ, et al. IL-22 promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin[J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(5):1321-1329. DOI:10.1038/jid.2012.463.

[18] Augustine JJ, Bodziak KA, Hricik DE. Use of sirolimus in solid organ transplantation[J]. *Drugs*, 2007, 67(3):369-391. DOI:10.2165/00003495-200767030-00004.

[19] Ruchin PE, Muller DW, Faddy SC, et al. Long-term clinical follow-up of sirolimus-eluting (CYPHER) coronary stents in the treatment of in-stent restenosis in an unselected population[J]. *Heart Lung Circ*, 2007, 16(6):440-446. DOI:10.1016/j.hlc.2007.02.090.

[20] Witzig TE, Kaufmann SH. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway in hematologic malignancies[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2006, 7(4): 285-294.



- DOI:10.1007/s11864-006-0038-1.
- [21] Phung TL, Ziv K, Dabydeen D, et al. Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin [J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(2):159-170. DOI:10.1016/j.ccr.2006.07.003.
- [22] 贺伟峰. 皮肤  $\gamma\delta$ T 细胞各亚群在创面再上皮化过程中的调控作用及其相关机制[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2022, 38(2): 114-118. DOI:10.3760/cma.j.cn501120-20211210-00411.
- [23] 刘勉, 朱海杰, 杨加彩, 等. 树突状表皮 T 淋巴细胞对小鼠创缘表皮细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2020, 36(2): 122-130. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2020.02.008.
- [24] 王珏, 张小容, 贺伟峰, 等. 树突状表皮 T 细胞在创面愈合中作用机制的研究进展[J]. *中华烧伤杂志*, 2021, 37(3):296-300. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200226-00092.
- [25] Zheng Y, Collins SL, Lutz MA, et al. A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy[J]. *J Immunol*, 2007, 178(4):2163-2170. DOI:10.4049/jimmunol.178.4.2163.
- [26] Schutysse E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(5):409-426. DOI:10.1016/s1359-6101(03)00049-2.
- [27] Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis[J]. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6621-6632. DOI:10.4049/jimmunol.164.12.6621.
- [28] Mabuchi T, Singh TP, Takekoshi T, et al. CCR6 is required for epidermal trafficking of  $\gamma\delta$ -T cells in an IL-23-induced model of psoriasisform dermatitis[J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(1): 164-171. DOI:10.1038/jid.2012.260.
- [29] Furue K, Ito T, Tsuji G, et al. The CCL20 and CCR6 axis in psoriasis[J]. *Scand J Immunol*, 2020, 91(3):e12846. DOI:10.1111/sji.12846.
- [30] Fujita H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases[J]. *J Dermatol Sci*, 2013, 72(1): 3-8. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.028.
- [31] Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, et al. IL-22, but not IL-17, dominant environment in cutaneous T-cell lymphoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(24): 7529-7538. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1192.
- [32] Avitabile S, Odorisio T, Madonna S, et al. Interleukin-22 promotes wound repair in diabetes by improving keratinocyte pro-healing functions[J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(11): 2862-2870. DOI: 10.1038/jid.2015.278.
- [33] Kolumam G, Wu X, Lee WP, et al. IL-22R ligands IL-20, IL-22, and IL-24 promote wound healing in diabetic db/db mice[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1):e0170639. DOI:10.1371/journal.pone.0170639.
- [34] Tillack C, Ehmann LM, Friedrich M, et al. Anti-TNF antibody-induced psoriasisform skin lesions in patients with inflammatory bowel disease are characterised by interferon- $\gamma$ -expressing Th1 cells and IL-17A/IL-22-expressing Th17 cells and respond to anti-IL-12/IL-23 antibody treatment[J]. *Gut*, 2014, 63(4): 567-577. DOI:10.1136/gutjnl-2012-302853.
- [35] Van Belle AB, de Heusch M, Lemaire MM, et al. IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasisform skin inflammation in mice [J]. *J Immunol*, 2012, 188(1):462-469. DOI:10.4049/jimmunol.1102224.

(收稿日期:2020-12-09)

## · 消息 ·

## 关于开展创面修复学科建设百千万五年行动计划的通知

为保障创面修复科等相关科室能力建设,进一步提升创面修复诊疗能力和规范化水平,加强慢性创面修复专业技术的推广,充分发挥继续教育在专科人才培养方面的重要作用,国家卫生健康委能力建设和继续教育中心组织相关专家共同开展调研分析,经多次研究论证,拟定于2022年5月—2027年4月开展创面修复学科建设百千万五年行动。该计划主要面向基层临床专科管理人员、医师、护士及相关技术人员开展创面修复相关技能培训,主要包括:(1)探索构建符合我国创面修复专科人才培养体系。(2)建立创面修复学科培训基地建设体系。(3)培养一批创面修复学科的优秀人才队伍和讲师团队。

项目联系人:郭常松,联系电话:010-83041862。具体情况详见《中华烧伤与创面修复杂志》网站:<http://www.zhsszz.org/>、<http://zhsszz.xml-journal.net/>及微信公众号。



微信公众号

国家卫生健康委能力建设和继续教育中心